

032

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 novembre 2002 (28.11.2002)

PCT

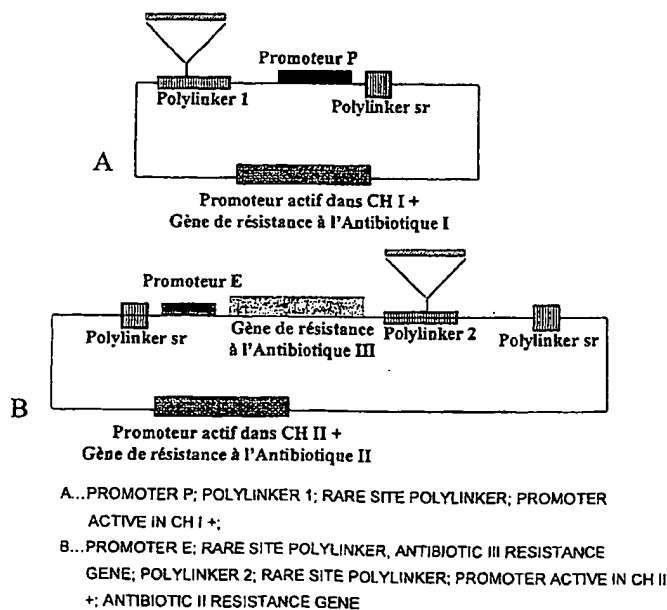
(10) Numéro de publication internationale
WO 02/095037 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : **C12N 15/65, 15/64** (72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **BERTAUX, Fabien** [FR/FR]; 23, impasse de la Morelière, F-69290 Grezieu La Varenne (FR). **LAGARDETTE, Florence** [FR/FR]; Le Terrier, F-69460 Saint Etienne Les Oullie (FR). **LAPIZE, Ckritine** [FR/FR]; 4, rue Latreille, F-38200 Vienne (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : **PCT/FR02/01682**
- (22) Date de dépôt international : 17 mai 2002 (17.05.2002)
- (25) Langue de dépôt : français (74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
01/06568 18 mai 2001 (18.05.2001) FR (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **GENOWAY** [FR/FR]; 181, avenue Jean Jaurès, Immeuble Chateaubriand, F-69007 Lyon (FR).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: DOUBLE SELECTION CLONING METHOD AND VECTORS THEREFOR

(54) Titre : PROCÉDE DE CLONAGE PAR DOUBLE SELECTION ET VECTEURS POUR CE PROCÉDE



(57) Abstract: The invention concerns a novel method for cloning a DNA fragment in a vector, by visual selection using two antibiotics as well as the vectors used for implementing said method, and a kit comprising said vectors.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un nouveau procédé de clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur, par une sélection visuelle en utilisant deux antibiotiques, ainsi qu'aux vecteurs utilisables pour la mise en oeuvre de ce procédé, et à un kit comprenant ces vecteurs.



MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

PROCEDE DE CLONAGE PAR DOUBLE SELECTION ET VECTEURS POUR CE PROCEDE

5 La présente invention se rapporte à un nouveau procédé de clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur, par une sélection visuelle en utilisant deux antibiotiques, ainsi qu'aux vecteurs utilisables pour la mise en œuvre de ce procédé, et à un kit comprenant ces vecteurs.

 Le clonage d'ADN dans un vecteur consiste à insérer un ou plusieurs
10 fragments d'ADN successivement ou non dans un vecteur afin de construire un nouveau vecteur. Lors de ces étapes de construction, on peut être confronté à de nombreux problèmes, parmi lesquels on peut citer un faible taux d'efficacité des réactions de ligation lors de l'introduction du fragment d'ADN, une instabilité du vecteur ayant intégré le fragment d'ADN induisant une sur-représentation du
15 vecteur de départ...

 Ces difficultés peuvent être observées pour tout type de vecteurs, tels les plasmides, les cosmides, les chromosomes artificiels (de bactéries, BAC, de levure, YAC, ou mammifères MAC), et en particulier pour des constructions complexes telles que la construction de vecteurs de recombinaison homologue, pour lesquels
20 on recherche l'introduction de fragments de grande taille (généralement entre 2 et 30 kilobases (kb), de préférence entre 2 et 7 kb) dans des vecteurs appropriés. Il peut être important d'intégrer, dans un vecteur pour la recombinaison homologue, deux fragments d'ADN différents consistant en les régions 3' et 5' du locus que l'on vise par recombinaison.

25 Il est notamment également préférable que ces vecteurs puissent être sélectionnés à la fois dans l'hôte de clonage (souvent un hôte inférieur, procaryote ou eucaryote unicellulaire, l'hôte le plus fréquent étant *Escherichia coli*) et dans la cellule mammifère cible (par exemple une cellule ES, de préférence murine ou issue d'un rongeur). En général, on recherche donc que les vecteurs présentent des gènes
30 de sélection (notamment de résistance aux antibiotiques) fonctionnels dans les deux organismes.

 Il existe aujourd'hui quelques techniques permettant de sélectionner les événements d'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur, notamment la

sélection blanc/bleu, le fragment d'ADN étant inséré dans le gène *lacZ*, et menant à l'extinction de l'activité dudit gène (Ullman et al, J. Mol. Biol. 1967, 24, 339-43). Toutefois, dans les cas d'inserts difficiles à cloner, et même si l'on peut observer aisément les événements positifs de manière visuelle, le bruit de fond reste
5 important.

On peut aussi utiliser la suppression de l'activité du *ccdB* (Bernard et al, Gene, 1994, 148, 71-4). Toutefois, la préparation du plasmide avant le clonage nécessite d'utiliser une autre souche d'*E. coli* (*gyrA462*) que la souche dans laquelle on effectuera la sélection après clonage.

10 Les deux méthodes décrites ci-dessus ne permettent pas non plus de savoir si le fragment d'ADN inséré l'a été dans l'orientation souhaitée.

La présente invention se rapporte à un procédé de clonage (insertion) d'un fragment d'ADN dans un vecteur, ledit procédé permettant d'éliminer une part importante des événements ne résultant pas de la réaction d'insertion désirée. Il est
15 à noter que le procédé selon l'invention permet également de sélectionner les événements de clonage de l'ADN dans l'orientation désirée.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur A, ledit vecteur A comprenant un gène de résistance à un antibiotique I fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage, et un
20 promoteur P fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage, comprenant les étapes consistant à :

- a) intégrer de l'ADN dans le site polylinker d'un vecteur B utilisable dans des cellules II hôtes de clonage, ledit site polylinker étant localisé dans une cassette située entre deux sites de restrictions identiques ou différents, ladite cassette comprenant un gène III conférant une résistance à un antibiotique III dans les cellules I hôtes de clonage, ledit gène III n'étant pas sous le contrôle d'un promoteur lui permettant d'être actif dans les cellules I hôtes de clonage, ledit vecteur B présentant un gène II, actif dans les cellules II hôtes de clonage, de résistance à un antibiotique II,
25
30
- b) exciser ladite cassette du vecteur B par coupure avec les enzymes de restriction correspondant auxdits sites de restriction,

- c) effectuer une ligation de ladite cassette excisé dans ledit vecteur A linéarisé de telle sorte que ladite cassette est insérée sous le contrôle dudit promoteur I fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage,
- d) sélectionner les événements de ligation chez les cellules I hôtes de clonage résistantes à la fois à l'antibiotique I et à l'antibiotique III.

5

De préférence, les vecteurs A et B sont des plasmides, mais ces vecteurs peuvent également être des cosmides, ou des chromosomes artificiels.

Le site « polylinker » est un site permettant l'intégration de l'ADN extérieur, et comportant généralement quelques (entre 1-2 et 5-7) sites de restriction.

10

Il est intéressant de noter que la sélection étant effectuée par la double résistance aux antibiotiques I et III, ceci permet d'obtenir également un clonage orienté, dans la mesure où le gène III, pour être fonctionnel, doit être orienté de telle façon à se retrouver sous le contrôle du promoteur P.

15

Dans un mode de mise en œuvre particulier de l'invention, les cellules I hôtes de clonage et les cellules II hôtes de clonage sont des cellules procaryotes, de préférence *Escherichia coli*. Toutefois, ces cellules peuvent être des cellules eucaryotes, les cellules I et II n'étant pas nécessairement identiques. Il est donc possible que les cellules II soient des levures et que les cellules I soient des bactéries. D'autres hôtes de clonages peuvent aussi être utilisés, par exemple des phages.

20

Dans un mode de réalisation préférée de l'invention, ledit gène III confère également une résistance à un antibiotique dans des cellules eucaryotes, notamment des cellules de mammifères, de préférence les cellules ES de rongeurs, souris, porcines, ovines, bovines, de lapin, ou humaines. Un gène particulièrement préféré est le gène de résistance à la kanamycine dans les cellules procaryotes, qui induit également une résistance à la néomycine dans les cellules eucaryotes. Il est intéressant que le gène III puisse être utilisé dans les deux types cellulaires, notamment pour sélectionner les événements de recombinaison homologues dans les cellules eucaryotes. L'homme du métier connaît différents gènes possédant ces propriétés, et on peut aussi citer, de façon non exhaustive, la zéocine, ou l'hygromycine B.

25

30

Il est à noter que dans un cas particulier de mise en œuvre de l'invention, on utilise, au lieu d'un gène III de résistance à un antibiotique, un gène marqueur, qui permet aussi de vérifier la présence de l'insert. On peut notamment utiliser le gène lacZ ou le gène codant pour la GFP.

- 5 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, lesdits gènes I et II sont identiques. On peut choisir différents gènes de résistance à des antibiotiques, et notamment le gène induisant la résistance à l'ampicilline. Les gènes de résistance aux antibiotiques utilisables dans les vecteurs de clonage sont bien connus de l'homme du métier, et on peut notamment citer les gènes de résistance à
- 10 l'hygromycine B, au chloramphénicol, à la tétracycline, à la zéocine, sans que cette liste ne soit exhaustive.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, lesdits sites de restriction flanquant la cassette contenant le polylinker dans le vecteur B sont rares.

- Par « site de restriction rare », on entend un site de restriction dont la
- 15 fréquence de coupure est supérieure à 10 kb, de préférence 15 kb, de façon plus préférée 20 kb dans le génome humain, murin, de l'organisme cible en général. Parmi les enzymes rares, on peut notamment citer *PmeI*, *SgrAI*, *RsrII*, *ClaI*, *NotI*, *AscI*, *PacI*, *SrfI*, *NheI*, *FseI*, *NsiI*, *SceI*. On peut aussi citer les sites des « Homing endonucleases ». Ces enzymes sont des protéines codées par des gènes possédant
- 20 des introns s'auto-épissant. Ces enzymes effectuent des coupures site-spécifiques dans de l'ADN double brin, et reconnaissent généralement des sites de 18-20 bases ou plus. On note en particulier *I-PpoI*, *I-CreI*, *I-CeuI*, *PI-PsI*, *I-SceI*, *PI-SceI*. Ces enzymes sont dites « très rares ».

- Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, ledit vecteur A
- 25 possède également un site polylinker permettant ou ayant permis l'insertion d'un fragment d'ADN. Ceci permet en effet de pouvoir effectuer le clonage des régions 5' et 3' du locus cible visé pour la recombinaison homologue plus facilement, puisqu'on intègre de façon préférentielle la région 3' ou la région 5' dans le plasmide A, avant d'utiliser le procédé selon l'invention avec l'autre région et le
- 30 plasmide B. Il est alors intéressant que la linéarisation de A soit effectuée en utilisant une enzyme de restriction rare ou très rare, telles que définies plus haut.

L'homme du métier sait définir les promoteurs P actifs dans les hôtes de clonage I. Dans les modes de mise en œuvre préférés de l'invention, ledit promoteur

P est choisi parmi le promoteur pour le gène de résistance à la kanamycine du transposon Tn5, le promoteur du gène bla (résistance à l'ampicilline), le promoteur de l'opéron tryptophane Trp, le promoteur de l'opéron lactose, ou tout autre promoteur accessible dans la base de données PromEC
5 (<http://bioinfo.md.huji.ac.il/marg/promec>).

Dans un cas particulier de mise en œuvre de l'invention, les vecteurs selon l'invention possèdent également les caractéristiques suivantes :

- ledit gène III dans ladite cassette dans le vecteur B est sous la dépendance d'un promoteur Eb actif dans les cellules eucaryotes,
10 notamment mammifères, ou
- ledit vecteur A présente un promoteur Ea actif dans les cellules eucaryotes, notamment mammifères, situé de telle sorte que ledit gène III est sous le contrôle dudit promoteur Ea après insertion dans le vecteur A.

15 L'homme du métier connaît les promoteurs pouvant être utilisés dans les hôtes II de clonage. Dans les modes de réalisation préférés pour lesquels les hôtes II sont des cellules eucaryotes, lesdits promoteurs Ea et Eb sont choisis parmi les promoteurs de la bêta-actine de poulet, du PGK, de la thymidine kinase du virus d'herpes simplex, du SV40, ou bien le « immediate early enhancer » du
20 cytomégalovirus humain.

Ce mode de réalisation est notamment préféré lorsque le gène III est peut induire une résistance à un antibiotique à la fois dans les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes, notamment de mammifères. Les promoteurs hybrides couplés procaryotes-eucaryotes sous le contrôle desquels se trouve alors ledit gène III après
25 la mise en œuvre du procédé sont similaires aux promoteurs décrits notamment pour les plasmides pEGFP-C1 dans Cormack et al (1996, Gene, 173, 33-8) ou pGN dans LeMouellic et al (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 4712-6).

Ainsi qu'il a été précisé, il est souvent intéressant d'utiliser le procédé selon l'invention pour la préparation de vecteurs destinés à la recombinaison homologue
30 dans des cellules souches d'organismes pluricellulaires. Ainsi on insère un premier fragment (par exemple 3' ou 5' d'un locus cible) dans le vecteur A, l'autre fragment dans le vecteur B, et on effectue la construction du vecteur final, de grande taille, par le procédé selon l'invention.

Ainsi, dans un cas particulier, les fragments d'ADN introduits dans ledit vecteur B et de façon optionnelle dans ledit vecteur A sont des fragments d'ADN génomique, de façon préférée issus d'un même hôte. Dans un cas particulièrement préféré, lesdits fragments sont les fragments 3' et 5' d'un même locus, qui est cible
5 pour la recombinaison homologue.

L'hôte en question est de préférence un mammifère, mais peut aussi être une levure, un fungus ou une bactérie. Dans le cas des mammifères, on cite les rongeurs (notamment souris, rats, lapins), mais aussi les porcins, les ovins, les bovins, les canins, les félins, et éventuellement les humains.

10 Le procédé selon l'invention permet donc, selon les modes de mise en oeuvre :

- une sélection visuelle positive des clones ayant incorporé l'insert désiré, puisque seuls ceux-ci peuvent survivre sur le milieu de sélection,

- un gain de temps sur la construction du vecteur final puisque l'étape
15 impliquant la création d'un vecteur de grande taille est celle où la sélection positive s'opère. De plus, l'insertion de deux inserts (par exemple 5' et 3' d'un même locus) s'effectue dans deux vecteurs différents lors de la première étape, non pas successivement.

- l'utilisation du gène de résistance III permet, quand il est fonctionnel à la
20 fois dans les cellules procaryotes et eucaryotes, de pouvoir effectuer la réaction de recombinaison homologue dans les cellules eucaryotes directement après le clonage (éventuellement après linéarisation du vecteur final ou excision de l'insert), et de pouvoir aisément sélectionner les événements de recombinaison dans ces cellules.

Les vecteurs selon la présente invention sont également objets de la présente
25 invention, seuls, ou en combinaison dans un kit, lui-même également objet de l'invention.

L'invention a donc aussi pour objet un kit pour le clonage de fragments d'ADN dans un vecteur A, comprenant :

- un vecteur A, basé sur un squelette de vecteur usuel de clonage
30 dans des cellules hôtes de clonage, ledit vecteur comprenant un gène de résistance à un antibiotique I fonctionnel dans lesdites cellules I, présentant de 5' en 3', :

- éventuellement un polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur,
- un promoteur P fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage,
- 5 - éventuellement un promoteur Ea fonctionnel dans les cellules eucaryotes, notamment de mammifères, situé immédiatement à côté (en 3' ou en 5') dudit promoteur, de telle sorte qu'un gène placé sous le contrôle dudit promoteur Ea soit également fonctionnel dans les cellules
- 10 I hôtes de clonage par l'effet du promoteur P,
- un polylinker contenant des sites rares de restriction,
- éventuellement un autre polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur,
- 15 - un vecteur B, basé sur un squelette de vecteur usuel de clonage dans des cellules II hôtes de clonage, présentant de 5' en 3' :
 - un polylinker contenant des sites rares de restriction,
 - éventuellement un promoteur Eb fonctionnel dans les cellules eucaryotes, notamment de mammifères,
 - 20 - un gène III conférant une résistance à un antibiotique III dans les cellules I hôtes de clonage, sous le contrôle éventuel du promoteur Eb,
 - éventuellement une séquence de poléadénylation,
 - un polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur B,
 - 25 - un polylinker contenant des sites rares de restriction.

Les vecteurs A et B sont dérivés de vecteurs usuels utilisés pour le clonage de fragments d'ADN. L'homme du métier comprend le terme « dérivé », qui signifie notamment que le vecteur final possède globalement le même squelette (notamment les origines de répllication, et éléments stabilisateurs...) que le vecteur de départ dont il est dérivé. Il est important de noter que ceci signifie également que, de préférence, les éléments intergéniques sont conservés. Les modifications apportées dans le vecteur de base sont donc restreintes et ne modifient pas l'hôte de

30 répllication du vecteur, ni ses propriétés fondamentales (nombre de copies, taille de

l'insert, stabilité...). On peut toutefois envisager de changer les gènes de sélection (résistance aux antibiotiques), pour autant que ceci ne modifie pas les autres propriétés du vecteur.

Dans les modes de réalisation préférés de l'invention, les vecteurs A et B
5 sont dérivés des vecteurs pUC19, pBR322, pBluescript, ou les vecteurs pRs de levures.

Dans un mode de réalisation préféré, le vecteur B présente ledit promoteur Eb fonctionnel dans les cellules eucaryotes si aucun promoteur Ea fonctionnel dans les cellules eucaryotes n'est présent sur le vecteur A.

10 Dans un autre mode de réalisation, ni le vecteur A, ni le vecteur B ne présentent de promoteurs fonctionnels dans les cellules eucaryotes.

Dans un mode de réalisation préféré, le kit selon l'invention contient également les instructions permettant la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention.

15

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Exemple de vecteurs A et B utilisables dans le procédé selon l'invention, selon l'exemple 1, version C. Le vecteur A induit la résistance à l'antibiotique I, mais pas à l'antibiotique III. Le vecteur B induit une résistance à l'antibiotique II,
20 mais pas de résistance à l'antibiotique III. Polylinker sr : sites de restrictions) ; CH : cellules hôtes de clonage. Polylinkers 1 et 2 : permettent de cloner de l'ADN exogène, préférentiellement génomique.

Figure 2 : Vecteur final obtenu après digestion de A et B avec une enzyme de restriction située dans le polylinker SR, ligation de l'insert issu de B dans A, et
25 sélection avec les antibiotiques I et III.

Les exemples d'application qui suivent ne servent qu'à illustrer certains aspects de l'invention, sans la restreindre en aucun cas.

EXEMPLES

30 Exemple 1 : Construction des plasmides selon l'invention

Version A

Plasmide 1 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique
- un promoteur procaryote
- un promoteur eucaryote, couplé au promoteur procaryote
- 5 - un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'insertion de l'insert provenant du plasmide 2.

Plasmide 2 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- 10 - un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'excision de l'insert
- un ADNc codant pour la néomycine transférase ou tout autre gène de résistance actif en procaryotes et eucaryotes
- une séquence de polyadénylation
- 15 - un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique
- un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'excision de l'insert.

Version B

20 Plasmide 1 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique
- un promoteur eucaryote
- 25 - un promoteur procaryote, couplé au promoteur eucaryote
- un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'insertion de l'insert provenant du plasmide 2.

Plasmide 2 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- 30 - un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'excision de l'insert
- un ADNc codant pour la néomycine transférase ou tout autre gène de résistance actif en procaryotes et eucaryotes

- une séquence de polyadénylation
- un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique
- un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'excision de l'insert.

Version C

Plasmide 1 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique
- un promoteur procaryote
- un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'insertion de l'insert provenant du plasmide 2.

Plasmide 2 : Dans un squelette plasmidique de type pUC19 (résistant à l'ampicilline), on introduit de 5' en 3' :

- un polylinker contenant des sites rares de restriction permettant l'excision de l'insert
- un promoteur eucaryote
- un ADNc codant pour la néomycine transférase ou tout autre gène de résistance actif en procaryotes et eucaryotes
- une séquence de polyadénylation
- un polylinker permettant l'introduction de fragment d'ADN génomique.

Il est à noter que l'on peut introduire, au lieu du gène codant pour la néomycine transférase, un gène codant pour un autre antibiotique (par exemple l'hygromycine), ou un gène marqueur tel le gène lacZ ou le gène de la GFP, dans une variante du procédé selon l'invention.

Revendications

1. Procédé de clonage d'un fragment d'ADN dans un vecteur A comprenant un
gène de résistance à un antibiotique I fonctionnel dans les cellules I hôtes de
5 clonage, et un promoteur P fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage,
comprenant les étapes consistant à :
 - a) intégrer de l'ADN dans le site polylinker d'un vecteur B utilisable
dans des cellules II hôtes de clonage, ledit site polylinker étant
localisé dans une cassette située entre deux sites de restrictions
10 identiques ou différents, ladite cassette comprenant un gène III
conférant une résistance à un antibiotique III dans les cellules I hôtes
de clonage, ledit gène III n'étant pas sous le contrôle d'un promoteur
lui permettant d'être actif dans les cellules I hôtes de clonage, ledit
vecteur B présentant un gène II, actif dans les cellules II hôtes de
15 clonage, de résistance à un antibiotique II,
 - b) exciser ladite cassette du vecteur B par coupure avec les enzymes de
restriction correspondant auxdits sites de restriction,
 - c) effectuer une ligation de ladite cassette excisé dans ledit vecteur A
linéarisé de telle sorte que ladite cassette est insérée sous le contrôle
20 dudit promoteur I fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage,
 - d) sélectionner les événements de ligation chez les cellules I hôtes de
clonage résistantes à la fois à l'antibiotique I et à l'antibiotique III.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les cellules I hôtes de
25 clonage et les cellules II hôtes de clonage sont des cellules procaryotes.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit gène III
confère également une résistance à un antibiotique dans des cellules eucaryotes
notamment des cellules de mammifères.
30
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdits gènes
I et II sont identiques.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lesdits sites de restriction sont rares.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit vecteur
5 A possède également un site polylinker permettant ou ayant permis l'insertion d'un fragment d'ADN.
7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que ledit promoteur P est choisi parmi le promoteur pour le gène de résistance à la
10 kanamycine du transposon Tn5, le promoteur du gène bla (résistance à l'ampicilline), le promoteur de l'opéron tryptophane Trp, le promoteur de l'opéron lactose, ou tout autre promoteur accessible dans la base de données PromEC.
- 15 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que
 - ledit gène III dans ladite cassette dans le vecteur B est sous la dépendance d'un promoteur Eb actif dans les cellules eucaryotes, notamment mammifères, ou
 - ledit vecteur A présente un promoteur Ea actif dans les cellules
20 eucaryotes, notamment mammifères, situé de telle sorte que ledit gène III est sous le contrôle dudit promoteur Ea après insertion dans le vecteur A.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit promoteur E est
25 choisi parmi les promoteurs de la bêta-actine de poulet, du PGK, de la thymidine kinase du virus d'herpes simplex, du SV40, ou bien le « immediate early enhancer » du cytomégalovirus humain.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les fragments
30 d'ADN introduits dans ledit vecteur B et de façon optionnelle dans ledit vecteur A sont des fragments d'ADN génomique issus d'un même hôte.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que lesdits fragments sont les fragments 3' et 5' d'un même locus.

12. Kit pour le clonage de fragments d'ADN dans un vecteur A, comprenant :

- 5 - un vecteur A présentant de 5' en 3', sur un squelette de vecteur usuel de clonage dans des cellules I hôtes de clonage, ledit vecteur comprenant un gène de résistance à un antibiotique I fonctionnel dans lesdites cellules I :
 - 10 - éventuellement un polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur,
 - un promoteur P fonctionnel dans les cellules I hôtes de clonage,
 - éventuellement un promoteur Ea fonctionnel dans les cellules eucaryotes, notamment de mammifères, situé
 - 15 immédiatement à côté (en 3' ou en 5') dudit promoteur,
 - un polylinker contenant des sites rares de restriction,
 - éventuellement un polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur,
- un vecteur B présentant de 5' en 3', sur un squelette de vecteur
- 20 usuel de clonage dans des cellules II hôtes de clonage :
 - un polylinker contenant des sites rares de restriction,
 - éventuellement un promoteur Eb fonctionnel dans les cellules eucaryotes, notamment de mammifères,
 - un gène III conférant une résistance à un antibiotique III
 - 25 dans les cellules I hôtes de clonage, sous le contrôle éventuel du promoteur Eb,
 - éventuellement une séquence de poléadénylation,
 - un polylinker permettant l'introduction de fragments d'ADN dans ledit vecteur B,
 - 30 - un polylinker contenant des sites rares de restriction.

13. Kit selon la revendication 12, caractérisé en ce que le vecteur B présente ledit promoteur Eb fonctionnel dans les cellules eucaryotes si aucun promoteur Ea fonctionnel dans les cellules eucaryotes n'est présent sur le vecteur A.
- 5 14. Kit selon l'une des revendications 12 ou 13, pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'une des revendications 1 à 11.

1 / 2

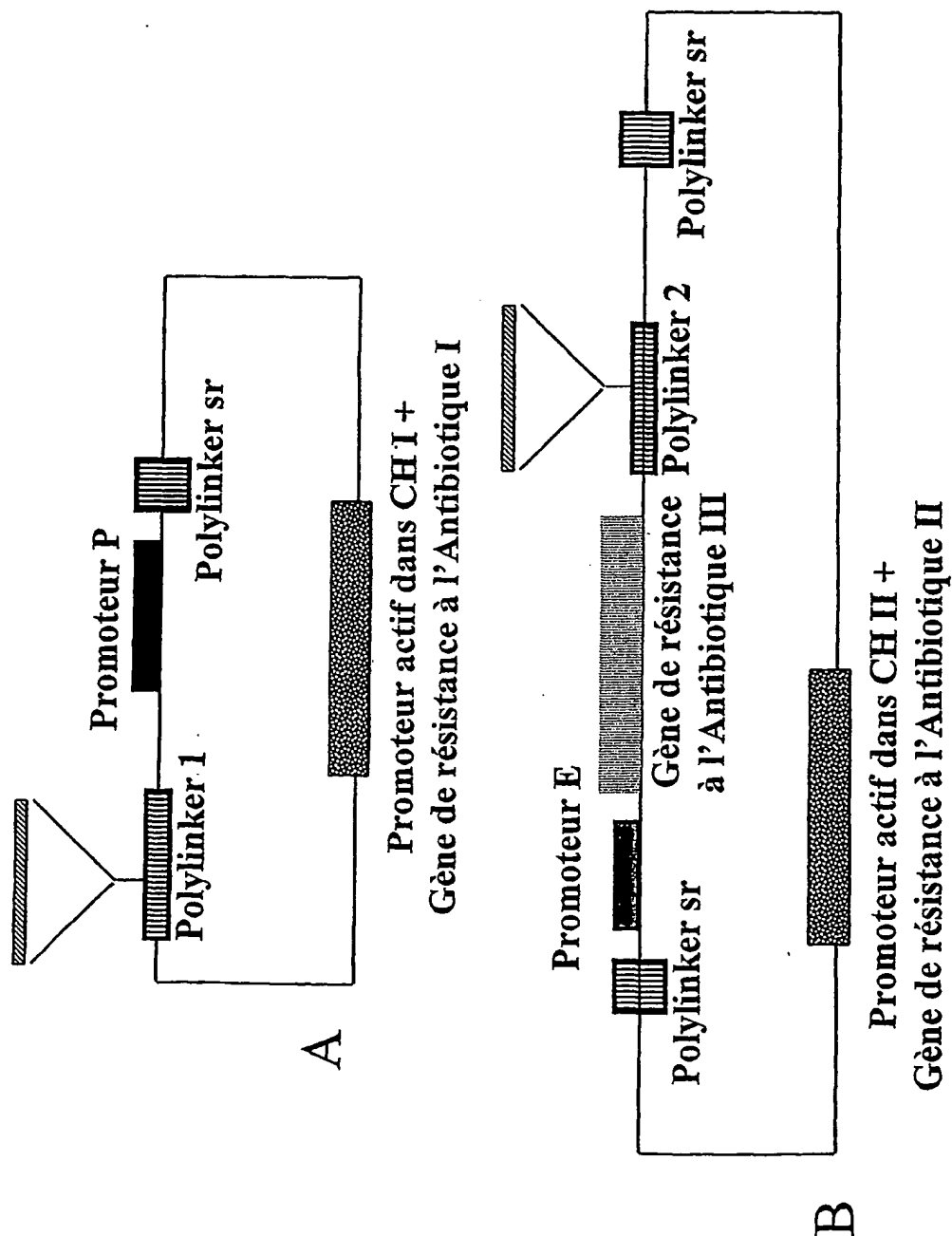


Figure 1

2 / 2

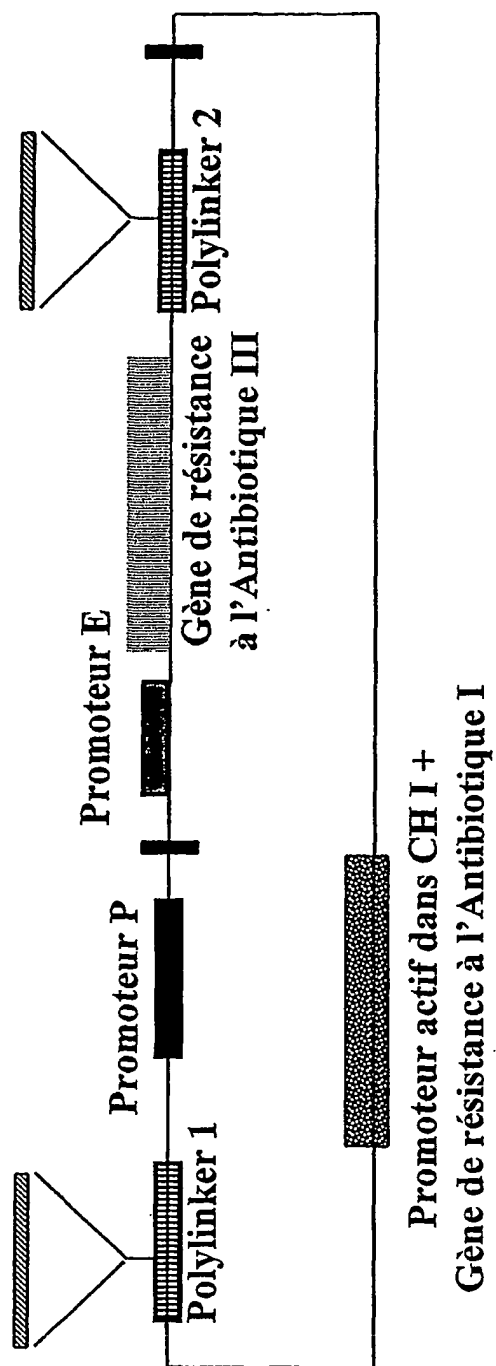


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/65 C12N15/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 11354 A (PASTEUR INSTITUT) 4 October 1990 (1990-10-04) the whole document	
A	LE MOUËLLIC H ET AL: "TARGETED REPLACEMENT OF THE HOMEOBOX GENE HOX-3.1 BY THE ESCHERICHIA-COLI LACZ IN MOUSE CHIMERIC EMBRYOS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 87, no. 12, 1990, pages 4712-4716, XP002189922 1990 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2002

Date of mailing of the international search report

06/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/01682

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 23239 A (AMGEN INC) 14 May 1999 (1999-05-14) the whole document ----	
A	YAVUZER U ET AL: "PWITCH: A VERSATILE TWO-HYBRID ASSAY VECTOR FOR THE PRODUCTION OF EPITOPE/ACTIVATION DOMAIN-TAGGED PROTEINS BOTH IN VITRO AND IN YEAST" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 165, 1995, pages 93-96, XP000605469 ISSN: 0378-1119 the whole document ----	
A	GABANT P ET AL: "New positive selection system based on the parD (kis/kid) system of the R1 plasmid" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 28, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 784-788, XP000910383 ISSN: 0736-6205 the whole document ----	
A	EP 0 426 455 A (SAGAMI CHEM RES) 8 May 1991 (1991-05-08) the whole document ----	
A	EP 0 814 165 A (SUNTORY LTD) 29 December 1997 (1997-12-29) the whole document ----	
A	WO 01 04306 A (GENENTECH INC ;CROWLEY CRAIG W (US); KRUMMEN LYNNE A (US); MENG YU) 18 January 2001 (2001-01-18) the whole document ----	
A	WO 01 31039 A (INVITROGEN CORP) 3 May 2001 (2001-05-03) the whole document -----	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/01682

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9011354	A	04-10-1990	FR 2646438 A1	02-11-1990
			AT 132189 T	15-01-1996
			DE 69024440 D1	08-02-1996
			DE 69024440 T2	08-08-1996
			DK 419621 T3	29-01-1996
			EP 0419621 A1	03-04-1991
			EP 0682111 A1	15-11-1995
			EP 0682112 A1	15-11-1995
			ES 2081977 T3	16-03-1996
			WO 9011354 A1	04-10-1990
			HK 150696 A	16-08-1996
			JP 3298842 B2	08-07-2002
			JP 11318479 A	24-11-1999
			JP 3504335 T	26-09-1991
			JP 3059481 B2	04-07-2000
			JP 3298864 B2	08-07-2002
			JP 2001120284 A	08-05-2001
			SG 49110 A1	18-05-1998
			SG 49112 A1	18-05-1998
WO 9923239	A	14-05-1999	US 6090554 A	18-07-2000
			AU 7721398 A	24-05-1999
			CA 2308016 A1	14-05-1999
			EP 1025252 A1	09-08-2000
			JP 2001521749 T	13-11-2001
			WO 9923239 A1	14-05-1999
EP 0426455	A	08-05-1991	DE 69022165 D1	12-10-1995
			DE 69022165 T2	04-04-1996
			EP 0426455 A2	08-05-1991
			US 5624826 A	29-04-1997
			US 5783442 A	21-07-1998
			JP 4117292 A	17-04-1992
EP 0814165	A	29-12-1997	EP 0814165 A2	29-12-1997
			JP 10066587 A	10-03-1998
			US 5965444 A	12-10-1999
WO 0104306	A	18-01-2001	AU 5927300 A	30-01-2001
			EP 1196566 A1	17-04-2002
			WO 0104306 A1	18-01-2001
WO 0131039	A	03-05-2001	AU 1437801 A	08-05-2001
			EP 1224304 A1	24-07-2002
			WO 0131039 A1	03-05-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/01682

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/65 C12N15/64

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, CAB Data, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 90 11354 A (PASTEUR INSTITUT) 4 octobre 1990 (1990-10-04) le document en entier	
A	LE MOUËLLIC H ET AL: "TARGETED REPLACEMENT OF THE HOMEBOX GENE HOX-3.1 BY THE ESCHERICHIA-COLI LACZ IN MOUSE CHIMERIC EMBRYOS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 87, no. 12, 1990, pages 4712-4716, XP002189922 1990 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande le document en entier	

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 octobre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/11/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hornig, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/01682

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 99 23239 A (AMGEN INC) 14 mai 1999 (1999-05-14) le document en entier ----	
A	YAVUZER U ET AL: "PWITCH: A VERSATILE TWO-HYBRID ASSAY VECTOR FOR THE PRODUCTION OF EPITOPE/ACTIVATION DOMAIN-TAGGED PROTEINS BOTH IN VITRO AND IN YEAST" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 165, 1995, pages 93-96, XP000605469 ISSN: 0378-1119 le document en entier ----	
A	GABANT P ET AL: "New positive selection system based on the parD (kis/kid) system of the R1 plasmid" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 28, no. 4, avril 2000 (2000-04), pages 784-788, XP000910383. ISSN: 0736-6205 le document en entier ----	
A	EP 0 426 455 A (SAGAMI CHEM RES) 8 mai 1991 (1991-05-08) le document en entier ----	
A	EP 0 814 165 A (SUNTORY LTD) 29 décembre 1997 (1997-12-29) le document en entier ----	
A	WO 01 04306 A (GENENTECH INC ;CROWLEY CRAIG W (US); KRUMMEN LYNNE A (US); MENG YU) 18 janvier 2001 (2001-01-18) le document en entier ----	
A	WO 01 31039 A (INVITROGEN CORP) 3 mai 2001 (2001-05-03) le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/01682

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9011354	A	04-10-1990	FR 2646438 A1	02-11-1990
			AT 132189 T	15-01-1996
			DE 69024440 D1	08-02-1996
			DE 69024440 T2	08-08-1996
			DK 419621 T3	29-01-1996
			EP 0419621 A1	03-04-1991
			EP 0682111 A1	15-11-1995
			EP 0682112 A1	15-11-1995
			ES 2081977 T3	16-03-1996
			WO 9011354 A1	04-10-1990
			HK 150696 A	16-08-1996
			JP 3298842 B2	08-07-2002
			JP 11318479 A	24-11-1999
			JP 3504335 T	26-09-1991
			JP 3059481 B2	04-07-2000
			JP 3298864 B2	08-07-2002
			JP 2001120284 A	08-05-2001
			SG 49110 A1	18-05-1998
			SG 49112 A1	18-05-1998
WO 9923239	A	14-05-1999	US 6090554 A	18-07-2000
			AU 7721398 A	24-05-1999
			CA 2308016 A1	14-05-1999
			EP 1025252 A1	09-08-2000
			JP 2001521749 T	13-11-2001
			WO 9923239 A1	14-05-1999
EP 0426455	A	08-05-1991	DE 69022165 D1	12-10-1995
			DE 69022165 T2	04-04-1996
			EP 0426455 A2	08-05-1991
			US 5624826 A	29-04-1997
			US 5783442 A	21-07-1998
			JP 4117292 A	17-04-1992
EP 0814165	A	29-12-1997	EP 0814165 A2	29-12-1997
			JP 10066587 A	10-03-1998
			US 5965444 A	12-10-1999
WO 0104306	A	18-01-2001	AU 5927300 A	30-01-2001
			EP 1196566 A1	17-04-2002
			WO 0104306 A1	18-01-2001
WO 0131039	A	03-05-2001	AU 1437801 A	08-05-2001
			EP 1224304 A1	24-07-2002
			WO 0131039 A1	03-05-2001